

第2840795号

(45)発行日 平成10年(1998)12月24日

(24)登録日 平成10年(1998)10月23日

(51)Int.Cl.<sup>6</sup>

A61K 38/16

識別記号

ABL

F I

A61K 37/14

ABL

請求項の数5 (全3頁)

(21)出願番号 特願平3-517447

(86)(22)出願日 平成3年(1991)11月8日

(86)国際出願番号 PCT/JP91/01539

(87)国際公開番号 WO92/08477

(87)国際公開日 平成4年(1992)5月29日

審査請求日 平成8年(1996)1月25日

(31)優先権主張番号 特願平2-308036

(32)優先日 平2(1990)11月13日

(33)優先権主張国 日本 (JP)

(73)特許権者 99999999

参天製薬株式会社

大阪府大阪市東淀川区下新庄3丁目9番  
19号

(72)発明者 三田 四郎

兵庫県芦屋市東山町7丁目26番304号

(72)発明者 足田 光史

大阪府高槻市北大樋町15番1-417

(72)発明者 デグレ・ミシェル・フランソワ

フランス国セーン・アフリック(12400)

・リュ・デ・タンデ2番地

(74)代理人 弁理士 岸本 瑛之助 (外3名)

審査官 田村 聖子

最終頁に続く

(54)【発明の名称】角膜障害治療剤

1

(57)【特許請求の範囲】

【請求項1】ラクトフェリンおよびラクトパーオキシダーゼを有効成分として含む角膜障害治療剤。

【請求項2】ラクトフェリンを有効成分として含む角膜障害治療剤。

【請求項3】ラクトパーオキシダーゼを有効成分として含む角膜障害治療剤。

【請求項4】該有効成分を点眼剤の形態で含む請求の範囲1~3の内いずれか1の角膜障害治療剤。

【請求項5】該有効成分の濃度が0.01~3.0% (重量/重量) の範囲にある請求の範囲4による角膜障害治療剤。

【発明の詳細な説明】

技術分野

本発明はラクトフェリンおよび/またはラクトパーオ

2

キシダーゼを有効成分として含む角膜障害治療剤に関する。

背景技術

ラクトフェリンおよびラクトパーオキシダーゼはヒトや牛などの乳や涙液に含まれている蛋白質であり、これらが抗菌作用やリンパ球の増殖作用などの薬理作用を有することは知られている(特開平2-48534号公報参照)。

しかしながら、これら化合物の眼科領域についての報告はほとんどなされていない。

本発明者等はラクトフェリンおよびラクトパーオキシダーゼの新しい薬理作用を見つけ、眼科領域へ応用することを種々検討した結果、これらの化合物が優れた角膜実質細胞増殖促進作用を有し、角膜障害治療剤として有用であることを見い出した。

THIS PAGE BLANK (USPTO)

THIS PAGE BLANK (USPTO)

## 発明の開示

本発明は、ラクトフェリンおよび/またはラクトパーオキシダーゼを有効成分として含む角膜障害治療剤を提供するものである。

ラクトフェリンおよびラクトパーオキシダーゼは通常ヒトや牛などの動物の分泌物たとえば乳や涙液から得られる。したがって、これらは安全性の点では全く問題ない。

本発明者等はラクトフェリンおよびラクトパーオキシダーゼの新しい薬理作用を見出すべき研究し、眼科領域についての応用を鋭意検討した結果、これらの化合物が優れた角膜実質細胞増殖促進作用を有し、角膜障害治療剤となることを見い出した。

ラクトフェリンおよびラクトパーオキシダーゼが角膜実質細胞に対し増殖促進効果があるかどうかを調べるために、in vitroでのウサギ培養角膜実質細胞に対する作用とin vivoでのアルカリバーン角膜炎に対する作用を調べた。

詳細なデータは薬理試験の項で示すが、ラクトフェリンおよびラクトパーオキシダーゼは有意に角膜実質細胞の増殖を促進した。

この結果はラクトフェリンおよびラクトパーオキシダーゼが角膜潰瘍、角膜炎、眼手術等により引き起こされる各種の角膜障害に対する治療剤として有用なものであることを示している。

ラクトフェリンおよび/またはラクトパーオキシダーゼは経口投与、非経口投与のいずれでも投与することができるが点眼剤として投与することが好ましい。

本発明の角膜障害治療剤においては、ラクトフェリンおよびラクトパーオキシダーゼをそれぞれ単独に用いても、またはこれらを併用してもよい。

ラクトフェリンおよび/またはラクトパーオキシダーゼの投与量は症状や年齢、剤型等によって決められるが、点眼剤の例でいえば0.01~3.0% (重量/重量) の濃度が好ましい。

ラクトフェリンおよび/またはラクトパーオキシダーゼの製剤化は公知の方法を用いて行なわれる。たとえば点眼剤はラクトフェリンおよび/またはラクトパーオキシダーゼに必要に応じて等張化剤、緩衝剤、防腐剤、pH調整剤等の通常用いられる添加剤を加えて調製すれば良い。

## 発明を実施するための最良の形態

以下に処方の例をいくつか示す。

## 処方例

## 処方1 (100ml中)

ラクトフェリン	0.5g
塩化ナトリウム	0.9g
滅菌精製水	適量

## 処方2 (100ml中)

ラクトパーオキシダーゼ	0.5g
-------------	------

塩化ナトリウム	0.9g
滅菌精製水	適量
処方3 (100ml中)	
ラクトフェリン	0.25g
ラクトパーオキシダーゼ	0.25g
塩化ナトリウム	0.9g
滅菌精製水	適量

## 薬理試験

ラクトフェリンおよびラクトパーオキシダーゼが角膜実質細胞に対し増殖促進効果があるかどうかを調べるために、in vitroでのウサギ培養角膜実質細胞に対する作用とin vivoでのアルカリバーン角膜炎に対する作用を調べた。

## 1) ウサギ培養角膜実質細胞に対する作用

ウサギ培養角膜実質細胞を用い、<sup>3</sup>H-チミジンの細胞内への取り込み量を指標としてラクトフェリンおよびラクトパーオキシダーゼの増殖促進効果を調べた。

## (実験方法)

10<sup>4</sup> 個のウサギ角膜実質細胞を、5容積%の牛胎仔血清を含有させたTC-199培養液 (GIBCO社製) に浮遊させこれを96ウェル平底カルチャーブレート中でラクトフェリンもしくはラクトパーオキシダーゼとともに炭酸ガスインキュベーター中でCO<sub>2</sub> 5%で37°Cで24時間培養した。その後、<sup>3</sup>H-チミジン (AMERSHAM社製) を添加し、さらに37°Cで24時間培養を行なった後、細胞中に取り込まれた<sup>3</sup>H-チミジンの放射活性を液体シンチレーションカウンターを用いて測定した。

## (結果)

得られた結果を表1に示す。

表1：培養角膜実質細胞の増殖に対するラクトフェリンおよびラクトパーオキシダーゼの効果

薬物	<sup>3</sup> H-チミジンの取り込み量 (×10 <sup>4</sup> dpm)	増殖促進率 (%)
コントロール	13.16	—
ラクトフェリン	30 μg/ml	97.4
	100 μg/ml	169.1
	300 μg/ml	194.7
	1000 μg/ml	222.0
ラクトパーオキシダーゼ	30 μg/ml	44.8
	100 μg/ml	81.4
	300 μg/ml	101.6
	1000 μg/ml	101.9

表1からわかるように、ラクトフェリンおよびラクトパーオキシダーゼは濃度依存的に角膜実質細胞の増殖を有意に促進した。

## 2) アルカリバーン角膜炎に対する作用

50 in vivoでの効果を確認するため、ウサギでのアルカ

THIS PAGE BLANK (S...)

リバーン角膜炎に対するラクトフェリンおよびラクトバーオキシダーゼの効果を調べた。

(実験方法)

1Nの水酸化ナトリウム水溶液に浸した円形ロ紙(直径5mm)を1.5分間ウサギの角膜上に置き、角膜炎を惹起せしめ、生理食塩液にて洗浄を行なった。角膜炎惹起直後から1時間間隔で1日10回、生理食塩液に溶解した0.5重量%のラクトフェリンまたはラクトバーオキシダーゼ点眼剤を点眼した。13日間連続して点眼した後、角膜実質細胞の病理組織学的検査を行なった。

なお、コントロールとして生理食塩液を点眼した。

(結果)

下記のスコア表に従って評価を下した。

スコア表

0点	角膜の実質細胞の再生が全く見られない
0.5点	角膜の実質細胞の再生が極く軽度のもの
1点	角膜の実質細胞の再生が軽度のもの
2点	角膜の実質細胞の再生が中等度のもの
3点	角膜の実質細胞の再生が高度のもの

得られた結果を表2に示した。なお、各々のスコアは8眼のスコアの合計で表した。

表 2

薬物	スコア
コントロール	9.5点
ラクトフェリン	12.5点
ラクトバーオキシダーゼ	16.0点

10 この結果は、in vivo試験においてラクトフェリンまたはラクトバーオキシダーゼが角膜実質細胞の再生を有意に促進していることを明らかに示している。

産業上の利用可能性

本発明は、ラクトフェリンおよび/またはラクトバーオキシダーゼを有効成分として含む優れた角膜障害治療剤を提供するものである。

フロントページの続き

(58)調査した分野(Int.Cl. <sup>6</sup>, DB名)

A61K 38/40

CA (STN)

REGISTRY (STN)

MEDLINE (STN)

THIS PAGE IS BLANK (SPT.0)



Europäisches Patentamt  
European Patent Office  
Office européen des brevets



(11) Publication number:

0 579 830 A1

(12)

**EUROPEAN PATENT APPLICATION**  
published in accordance with Art.  
158(3) EPC

(21) Application number: 91919156.9

(51) Int. Cl.5: A61K 37/14, A61K 37/50

(22) Date of filing: 08.11.91

(86) International application number:  
PCT/JP91/01539

(87) International publication number:  
WO 92/08477 (29.05.92 92/12)

(30) Priority: 13.11.90 JP 308036/90

(43) Date of publication of application:  
26.01.94 Bulletin 94/04

(84) Designated Contracting States:  
AT BE CH DE DK ES FR GB GR IT LI LU NL SE

(71) Applicant: SANTEN PHARMACEUTICAL CO., LTD.  
9-19, 3-Chome, Shimoshinjo  
Higashiyodogawa-ku Osaka 533(JP)  
Applicant: BIO SERAE LABORATOIRES SA  
2, rue des Tendes  
F-12400 Saint Afrique(FR)

(72) Inventor: MITA, Shiro, 26-304,  
Higashiyamacho 7-chome  
Ashiya-shi  
Hyogo 659(JP)  
Inventor: HIKIDA, Mitsushi, 15-1-417,  
Kitaouchicho  
Takatsuki-shi  
Osaka 569(JP)  
Inventor: DEGRE, Michel, François  
2, rue des Tendes  
F-12400 St Afrique(FR)

(74) Representative: Peaucelle, Chantal et al  
Cabinet Armengaud Aine  
3, avenue Bugeaud  
F-75116 Paris (FR)

(54) THERAPEUTIC AGENT FOR CORNEAL LESION.

(57) A therapeutic agent for corneal lesion, containing lactoferrin and/or lactoperoxidase as the active ingredient. Lactoferrin and lactoperoxidase are proteins contained in the milk and tear of man, bovine, etc., and having an antibacterial activity and a pharmacological activity such as promotion of the growth of lymphocytes. However they have been scarcely applied to the ophthalmological field. The invention is based on the finding that they have a new pharmacological activity applicable to this field and are useful as a therapeutic agent for corneal lesion, because they have an excellent activity of promoting the growth of corneal parenchymal cells.

EP 0 579 830 A1

## TECHNICAL FIELD

This invention relates to therapeutic agents for corneal disorders, which contain lactoferrin and/or lactoperoxidase as (an) active ingredient(s).

5

## BACKGROUND ART

Lactoferrin and lactoperoxidase are proteins existing in milk or tears of human being, bovine, etc. and are known to have pharmacological effects such as antibacterial effect and proliferating effect of lymphocytes. (Japanese Unexamined Patent Publication 48534/1990, etc.)

10 However, there are few reports on their pharmacological effects in ophthalmology. Therefore, the inventors studied to find new pharmacological effects of lactoferrin and lactoperoxidase and to apply them in ophthalmological field. As the result, the inventors found that these compounds have stimulative effects on proliferation of corneal keratocytes and are useful for a treatment of corneal disorders.

15

## DISCLOSURE OF THE INVENTION

This invention provides therapeutic agents for corneal disorders, which contain lactoferrin and/or lactoperoxidase as (an) active ingredient(s).

20 Lactoferrin and lactoperoxidase can be obtained generally from secretions, for example, milk and tears, of human being or animals such as bovine. There is, therefore, no problem with safety of these.

The inventors studied to find new pharmacological effects of lactoferrin and lactoperoxidase and to apply them in ophthalmological field. As the result, the inventors found that these compounds have stimulative effects on proliferation of corneal keratocytes and are useful for a treatment of corneal disorders.

25 To examine the stimulative effects of lactoferrin and lactoperoxidase on proliferation of corneal keratocytes, the inventors tested these compounds using cultured rabbit corneal keratocytes in vitro and rabbit corneal alkali burn injury model in vivo.

As shown in the pharmacological test in detail, lactoferrin and lactoperoxidase significantly stimulated the proliferation of keratocytes.

30 The results indicate that lactoferrin and lactoperoxidase are useful for a treatment of various corneal disorders such as corneal injury caused by ulceration, inflammation or ophthalmological surgery, etc.

Lactoferrin and/or lactoperoxidase can be administered orally or parenterally, but the preferable dosage form is eye drops.

35 For the purpose of this invention, lactoferrin or lactoperoxidase is administered alone or they are administered together.

The dosage of lactoferrin and/or lactoperoxidase is adjusted depending on symptom, age, dosage form, etc. In case of eye drops, the concentration (W/W) of lactoferrin and/or lactoperoxidase is 0.01 - 3.0% preferably.

40 Pharmaceutical preparations of lactoferrin and/or lactoperoxidase can be prepared by the known methods. In eye drops of lactoferrin and/or lactoperoxidase, usual excipient(s) such as isotonic agents, buffer, preservatives or pH adjusting agents can be combined.

## BEST MODE FOR CARRYING OUT THE INVENTION

45 Examples of formulations are shown below.

## (FORMULATION EXAMPLES)

50

formulation 1		
lactoferrin	0.5 g	
sodium chloride	0.9 g	
sterile purified water	q.s.	
total	100 ml	

55

5

formulation 2	
lactoperoxidase	0.5 g
sodium chloride	0.9 g
sterile purified water	q.s.
total	100 ml

10

15

formulation 3	
lactoferrin	0.25g
lactoperoxidase	0.25g
sodium chloride	0.9 g
sterile purified water	q.s.
total	100 ml

## 20 (PHARMACOLOGICAL TEST)

To examine the stimulative effects of lactoferrin and lactoperoxidase on proliferation of corneal keratocytes, the inventors tested these compounds using cultured rabbit corneal keratocytes in vitro and rabbit corneal alkali burn injury model in vivo.

25

## 1. Effect on cultured rabbit corneal keratocytes

Using cultured rabbit corneal keratocytes, the stimulative effects of lactoferrin and lactoperoxidase were examined by counting uptake of  $^3\text{H}$ -thymidine into keratocytes.

30

## (Experimental Method)

Cultured rabbait corneal keratocytes ( $1 \times 10^4$  cells) were suspended in TC-199 medium (produced by GIBCO) containing 5 vol. % fetal calf serum. The keratocytes were cultured in a well of 96-well flat bottom culture plate with lactoferrin or lactoperoxidase at  $37^\circ\text{C}$  with 5%  $\text{CO}_2$  in a  $\text{CO}_2$  incubator. After 24 hr, the reaction mixture was plussed with  $^3\text{H}$ -thymidine (produced by AMERSHAM) and cultured at  $37^\circ\text{C}$  for 24 hr. The proliferation of keratocytes were measured by liquid scintillation counter by counting radio activity of  $^3\text{H}$ -thymidine uptake to keratocytes.

40

45

50

55

(Result)

5 The results were shown in Table 1.

Table 1

Effects of lactoferrin and lactoperoxidase on the proliferation of cultured keratocytes in vitro			
Samples		$^3\text{H}$ -thymidine uptake ( $\times 10^4$ dpm)	stimulation(%)
Control		13.16	-
Lactoferrin	30 $\mu\text{g}/\text{ml}$	25.98	97.4
	100 $\mu\text{g}/\text{ml}$	35.41	169.1
	300 $\mu\text{g}/\text{ml}$	38.78	194.7
	1000 $\mu\text{g}/\text{ml}$	42.37	222.0
Lactoperoxidase	30 $\mu\text{g}/\text{ml}$	19.05	44.8
	100 $\mu\text{g}/\text{ml}$	23.87	81.4
	300 $\mu\text{g}/\text{ml}$	26.53	101.6
	1000 $\mu\text{g}/\text{ml}$	26.57	101.9

10 As shown in Table 1, lactoferrin and lactoperoxidase significantly stimulated the proliferation of keratocytes in a dose-dependent manner.

25 2. Effect on corneal alkali burn injury

30 To confirm the effects of lactoferrin and lactoperoxidase in vivo, the inventors examined the effects of the compounds on rabbit corneal alkali burn injury.

35 30 (Experimental Method)

Filter disc (diameter : 5 mm) soaked in 1N NaOH was placed on the rabbit cornea for 1.5 minutes to elicit inflammation, and the cornea was washed with physiological saline. Just after the elicitation of inflammation, 0.5 wt. % eye drops of lactoferrin or lactoperoxidase dissolved in physiological saline was instilled 10 times per day at one hour intervals. After the continuous treatment for 13 days, the corneal keratocytes were examined histopathologically. As the control, physiological saline was instilled.

40 (result)

45 40 The evaluation was made according to the following score table.

Score Table	
0	No regeneration was observed.
0.5	Very slight regeneration was observed.
1.0	Slight regeneration was observed.
2.0	Moderate regeneration was observed.
3.0	Great regeneration was observed.

50 50 The results were shown in Table 2, in which each score was represented by total scores of eight eyes.

Table 2

test compound	score
control	9.5
lactoferrin	12.5
lactoperoxidase	16.0

5            The results proves that lactoferrin and lactoperoxidase significantly accelerate the regeneration of  
 10          corneal keratocytes in vivo test.

#### INDUSTRIAL APPLICABILITY

15          This invention provides excellent therapeutic agents for corneal disorders, which contain lactoferrin  
 and/or lactoperoxidase as (an) active ingredient(s).

#### Claims

- 20          1. A therapeutic agent for corneal disorders, which contains lactoferrin and lactoperoxidase as active ingredients.
- 25          2. A therapeutic agent for corneal disorders, which contains lactoferrin as an active ingredient.
- 30          3. A therapeutic agent for corneal disorders, which contains lactoperoxidase as an active ingredient.
- 35          4. A therapeutic agent for corneal disorders according to any one of claims 1, 2 and 3, wherein said therapeutic agent is in the form of eye drops and contains said active ingredient(s).
- 40          5. A therapeutic agent for corneal disorders as defined in claim 4, wherein concentration of said active ingredient ranges form 0.01 to 3.0 (W/W) %.
- 45          6. A method of treatment for corneal disorders, which comprises administering lactoferrin and lactoperoxidase as active ingredients.
- 50          7. A method of treatment for corneal disorders, which comprises administering lactoferrin as an active ingredient.
- 55          8. A method of treatment for corneal disorders, which comprises administering lactoperoxidase as an active ingredient.
- 60          9. A method of treatment for corneal disorders according to any one of claims 6, 7 and 8, wherein said active ingredient(s) is (are) instilled into eyes.
- 65          10. A method of treatment for corneal disorders, which comprises instilling eye drops containing lactoferrin and/or lactoperoxidase of which concentration ranges from 0.01 to 3.0 (W/W) %.
- 70          11. Use of lactoferrin and/or lactoperoxidase as (a) therapeutic agent(s) for corneal disorders.

50

55

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No. PCT/JP91/01539

<b>I. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER</b> (If several classification symbols apply, indicate all) <sup>1</sup>		
According to International Patent Classification (IPC) or to both National Classification and IPC		
Int. Cl <sup>5</sup> A61K37/14, 50		
<b>II. FIELDS SEARCHED</b>		
Minimum Documentation Searched <sup>7</sup>		
Classification System	Classification Symbols	
IPC	A61K37/14, 50	
Documentation Searched other than Minimum Documentation to the Extent that such Documents are Included in the Fields Searched <sup>8</sup>		
<b>III. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT</b> <sup>9</sup>		
Category <sup>10</sup>	Citation of Document, <sup>11</sup> with indication, where appropriate, of the relevant passages <sup>12</sup>	Relevant to Claim No. <sup>13</sup>
Y	Biochimica et Biophysica Acta, Vol. 715, No. 1, (1982), p. 116-120	1-11
Y	JP, A, 02-48534 (Societe Bio Cera S.A.), February 19, 1990 (19. 02. 90), Column of claim	1-11
<p><sup>1</sup> Special categories of cited documents: <sup>14</sup></p> <p><sup>"A"</sup> document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance</p> <p><sup>"E"</sup> earlier document but published on or after the international filing date</p> <p><sup>"L"</sup> document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason <sup>(as specified)</sup><sup>15</sup></p> <p><sup>"O"</sup> document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means</p> <p><sup>"P"</sup> document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed</p> <p><sup>"T"</sup> later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention</p> <p><sup>"X"</sup> document of particular relevance: the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step</p> <p><sup>"Y"</sup> document of particular relevance: the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art</p> <p><sup>"8"</sup> document member of the same patent family</p>		
<b>IV. CERTIFICATION</b>		
Date of the Actual Completion of the International Search	Date of Mailing of this International Search Report	
February 3, 1992 (03. 02. 92)	February 12, 1992 (12. 02. 92)	
International Searching Authority	Signature of Authorized Officer	
Japanese Patent Office		

PCT

世界知的所有権機関

国際事務局



特許協力条約に基づいて公開された国際出願

(51) 国際特許分類 5 A61K 37/14, 37/50		A1	(11) 国際公開番号 WO 92/08477
			(43) 国際公開日 1992年5月29日 (29.05.1992)
(21) 国際出願番号 POT/JP91/01539		(74) 代理人 弁理士 岸本英之助, 外 (KISHIMOTO, Einosuke et al.) 〒542 大阪府大阪市中央区西心斎橋1丁目13番18号 イナバビル6階 Osaka, (JP)	
(22) 国際出願日 1991年11月8日 (08.11.91)			
(30) 優先権データ 特願平2/308036 1990年11月13日 (13.11.90) JP			
(71) 出願人 (米国を除くすべての指定国について) 参天製薬株式会社 (SANTEN PHARMACEUTICAL CO., LTD.) [JP/JP] 〒533 大阪府大阪市東淀川区下新庄3丁目9番19号 Osaka, (JP) ピオ・セレ・ラボラトワール・エス・ア (BIO SERAE LABORATOIRES S. A.) [FR/FR] セーン・アフリック (12400)・リュ・デ・タンデ2番地 St Afrique, (FR)		(81) 指定国 AT (欧州特許), BE (欧州特許), CH (欧州特許), DE (欧州特許), DK (欧州特許), ES (欧州特許), FR (欧州特許), GB (欧州特許), GR (欧州特許), IT (欧州特許), JP, LU (欧州特許), NL (欧州特許), SE (欧州特許), US.	
(72) 発明者; および (75) 発明者/出願人 (米国についてのみ) 三田四郎 (MITA, Shiro) [JP/JP] 〒659 兵庫県芦屋市東山町7丁目26番304号 Hyogo, (JP) 疋田光史 (HIKIDA, Mitsushi) [JP/JP] 〒569 大阪府高槻市北大通町15番1-417 Osaka, (JP) デグレ・ミシェル・フランソワ (DEGRE, Michel Francois) [FR/FR] セーン・アフリック (12400)・リュ・デ・タンデ2番地 St Afrique, (FR)		添付公開書類 国際調査報告書	

(54) Title : THERAPEUTIC AGENT FOR CORNEAL LESION

(54) 発明の名称 角膜障害治療剤

(57) Abstract

A therapeutic agent for corneal lesion, containing lactoferrin and/or lactoperoxidase as the active ingredient. Lactoferrin and lactoperoxidase are proteins contained in the milk and tear of man, bovine, etc., and having an antibacterial activity and a pharmacological activity such as promotion of the growth of lymphocytes. However they have been scarcely applied to the ophthalmological field. The invention is based on the finding that they have a new pharmacological activity applicable to this field and are useful as a therapeutic agent for corneal lesion, because they have an excellent activity of promoting the growth of corneal parenchymal cells.

(57) 要約

本発明はラクトフェリンおよび／またはラクトパーオキシダーゼを有効成分として含む角膜障害治療剤に関する。

ラクトフェリンおよびラクトパーオキシダーゼはヒトや牛などの乳や涙液に含まれている蛋白質であり、これらが抗菌作用やリンパ球の増殖作用などの薬理作用を有することは知られているが、これら化合物の眼科領域についての報告はほとんどなされていない。

本発明は、ラクトフェリンおよびラクトパーオキシダーゼの新しい薬理作用を見つけ、眼科領域への応用研究の結果、これらの化合物が優れた角膜実質細胞増殖促進作用を有し、角膜障害治療剤として有用であることを見い出して、完成されたものである。

情報としての用途のみ

PCTに基づいて公開される国際出願のパンフレット第1頁にPCT加盟国を同定するために使用されるコード

AT	オーストリア	ES	スペイン	ML	マリ
AU	オーストラリア	FI	フィンランド	MN	モンゴル
BB	バルバードス	FR	フランス	MR	モーリタニア
BE	ベルギー	GA	ガボン	MW	マラウイ
BF	ブルキナ・ファソ	GI	ギニア	NL	オランダ
BG	ブルガリア	GB	イギリス	NO	ノルウェー
BJ	ベナン	GR	ギリシャ	PL	ポーランド
BR	ブラジル	HU	ハンガリー	RO	ルーマニア
CA	カナダ	IT	イタリー	SD	スードン
CF	中央アフリカ共和国	JP	日本	SE	スウェーデン
CG	コンゴー	KP	朝鮮民主主義人民共和国	SN	セネガル
CH	スイス	KR	大韓民国	SU*	ソビエト連邦
CI	コート・ジボアール	LI	リヒテンシュタイン	TD	チャード
CM	カメルーン	LK	スリランカ	TG	トーゴ
CS	チエコスロバキア	LU	ルクセンブルグ	US	米国
DE	ドイツ	MC	モナコ		
DK	デンマーク	MG	マダガスカル		

\*SUの指定はロシア連邦の指定としての効力を有する。しかし、その指定が旧ソヴィエト連邦のロシア連邦以外の他の国で効力を有するかは不明である。

- 1 -

## 明細書

### 角膜障害治療剤

5

#### 技術分野

本発明はラクトフェリンおよび／またはラクトパーオキシダーゼを有効成分として含む角膜障害治療剤に関する。

#### 背景技術

ラクトフェリンおよびラクトパーオキシダーゼはヒトや牛などの乳や涙液に含まれている蛋白質であり、これらが抗菌作用やリンパ球の増殖作用などの薬理作用を有することは知られている（特開平2-48534号公報参照）。

しかしながら、これら化合物の眼科領域についての報告はほとんどなされていない。

15 本発明者等はラクトフェリンおよびラクトパーオキシダーゼの新しい薬理作用を見つけ、眼科領域へ応用することを種々検討した結果、これらの化合物が優れた角膜実質細胞増殖促進作用を有し、角膜障害治療剤として有用であることを見い出した。

20

#### 発明の開示

本発明は、ラクトフェリンおよび／またはラクトパーオキシダーゼを有効成分として含む角膜障害治療剤を提供するものである。

25 ラクトフェリンおよびラクトパーオキシダーゼは通常ヒトや牛などの動物の分泌物たとえば乳や涙液から得られる。し

- 2 -

たがって、これらは安全性の点では全く問題ない。

本発明者等はラクトフェリンおよびラクトパーオキシダーゼの新しい薬理作用を見出すべく研究し、眼科領域についての応用を鋭意検討した結果、これらの化合物が優れた角膜実質細胞増殖促進作用を有し、角膜障害治療剤となることを見い出した。

ラクトフェリンおよびラクトパーオキシダーゼが角膜実質細胞に対し増殖促進効果があるかどうかを調べるため、*in vitro* でのウサギ培養角膜実質細胞に対する作用と *in vivo* 10 でのアルカリバーン角膜炎に対する作用を調べた。

詳細なデータは薬理試験の項で示すが、ラクトフェリンおよびラクトパーオキシダーゼは有意に角膜実質細胞の増殖を促進した。

この結果はラクトフェリンおよびラクトパーオキシダーゼ 15 が角膜潰瘍、角膜炎、眼手術等により引き起こされる各種の角膜障害に対する治療剤として有用なものであることを示している。

ラクトフェリンおよび/またはラクトパーオキシダーゼは経口投与、非経口投与のいずれでも投与することができるが 20 点眼剤として投与することが好ましい。

本発明の角膜障害治療剤においては、ラクトフェリンおよびラクトパーオキシダーゼをそれぞれ単独に用いても、またはこれらを併用してもよい。

ラクトフェリンおよび/またはラクトパーオキシダーゼの 25 投与量は症状や年齢、剤型等によって決められるが、点眼剤

- 3 -

の例でいえば 0.01 ~ 3.0% (重量/重量) の濃度が好ましい。

ラクトフェリンおよび/またはラクトパーオキシダーゼの製剤化は公知の方法を用いて行なわれる。たとえば点眼剤は 5 ラクトフェリンおよび/またはラクトパーオキシダーゼに必要に応じて等張化剤、緩衝剤、防腐剤、pH調整剤等の通常用いられる添加剤を加えて調製すれば良い。

発明を実施するための最良の形態

以下に処方の例をいくつか示す。

10. 処方例

処方 1 (100ml 中)

ラクトフェリン	0.5 g
塩化ナトリウム	0.9 g
滅菌精製水	適量

15. 処方 2 (100ml 中)

ラクトパーオキシダーゼ	0.5 g
塩化ナトリウム	0.9 g
滅菌精製水	適量

処方 3 (100ml 中)

ラクトフェリン	0.25 g
ラクトパーオキシダーゼ	0.25 g
塩化ナトリウム	0.9 g
滅菌精製水	適量

薬理試験

25. ラクトフェリンおよびラクトパーオキシダーゼが角膜実質

- 4 -

細胞に対し増殖促進効果があるかどうかを調べるために、*in vitro* でのウサギ培養角膜実質細胞に対する作用と *in vivo* でのアルカリバーン角膜炎に対する作用を調べた。

1) ウサギ培養角膜実質細胞に対する作用

5 ウサギ培養角膜実質細胞を用い、<sup>3</sup>H-チミジンの細胞内への取り込み量を指標としてラクトフェリンおよびラクトパーオキシダーゼの増殖促進効果を調べた。

(実験方法)

10  $10^4$  個のウサギ角膜実質細胞を、5容積%の牛胎仔血清を含有させたTC-199培養液 (GIBCO社製) に浮遊させこれを96ウェル平底カルチャープレート中でラクトフェリンもしくはラクトパーオキシダーゼとともに炭酸ガスインキュベーター中で  $CO_2$  5%で37°Cで24時間培養した。その後、<sup>3</sup>H-チミジン (AMERSHAM社製) を添加し、さらに3  
15 7°Cで24時間培養を行なった後、細胞中に取り込まれた<sup>3</sup>H-チミジンの放射活性を液体シンチレーションカウンターを用いて測定した。

(結果)

得られた結果を表1に示す。

- 5 -

表1：培養角膜実質細胞の増殖に対するラクトフェリンおよびラクトパーオキシダーゼの効果

薬物	$^3\text{H}$ - チミジン の取り込み量 ( $\times 10^4$ dpm)	増殖促進率 (%)
コントロール	13.16	-
ラクトフェリン 30 $\mu\text{g}/\text{ml}$	25.98	97.4
100 $\mu\text{g}/\text{ml}$	35.41	169.1
300 $\mu\text{g}/\text{ml}$	38.78	194.7
1000 $\mu\text{g}/\text{ml}$	42.37	222.0
ラクトパーオキ シダーゼ 30 $\mu\text{g}/\text{ml}$	19.05	44.8
100 $\mu\text{g}/\text{ml}$	23.87	81.4
300 $\mu\text{g}/\text{ml}$	26.53	101.6
1000 $\mu\text{g}/\text{ml}$	26.57	101.9

15 表1からわかるように、ラクトフェリンおよびラクトパーオキシダーゼは濃度依存的に角膜実質細胞の増殖を有意に促進した。

2) アルカリバーン角膜炎に対する作用

20 in vivoでの効果を確認するため、ウサギでのアルカリバーン角膜炎に対するラクトフェリンおよびラクトパーオキシダーゼの効果を調べた。

(実験方法)

25 1 Nの水酸化ナトリウム水溶液に浸した円形口紙（直径5 mm）を1.5分間ウサギの角膜上に置き、角膜炎を惹起せしめ、生理食塩液にて洗浄を行なった。角膜炎惹起直後から1

- 6 -

時間間隔で1日10回、生理食塩液に溶解した0.5重量%のラクトフェリンまたはラクトパーオキシダーゼ点眼剤を点眼した。13日間連続して点眼した後、角膜実質細胞の病理組織学的検査を行なった。

5 なお、コントロールとして生理食塩液を点眼した。

(結果)

下記のスコア表に従って評価を下した。

スコア表

0点	角膜の実質細胞の再生が全く見られない
0.5点	角膜の実質細胞の再生が極く軽度のもの
1点	角膜の実質細胞の再生が軽度のもの
2点	角膜の実質細胞の再生が中等度のもの
3点	角膜の実質細胞の再生が高度のもの

得られた結果を表2に示した。なお、各々のスコアは8眼  
15 のスコアの合計で表した。

表2

薬物	スコア
コントロール	9.5点
ラクトフェリン	12.5点
ラクトパーオキシダーゼ	16.0点

この結果は、in vivo試験においてラクトフェリンまたはラクトパーオキシダーゼが角膜実質細胞の再生を有意に促進していることを明らかに示している。

産業上の利用可能性

25 本発明は、ラクトフェリンおよび／またはラクトパーオキ

- 7 -

シダーゼを有効成分として含む優れた角膜障害治療剤を提供  
するものである。

5

10

15

20

25

- 8 -

### 請求の範囲

1. ラクトフェリンおよびラクトパーオキシダーゼを有効成分として含む角膜障害治療剤。
2. ラクトフェリンを有効成分として含む角膜障害治療剤。
- 5 3. ラクトパーオキシダーゼを有効成分として含む角膜障害治療剤。
4. 該有効成分を点眼剤の形態で含む請求の範囲1～3の内いずれか1の角膜障害治療剤。
5. 該有効成分の濃度が0.01～3.0%（重量／重量）  
10 の範囲にある請求の範囲4による角膜障害治療剤。
6. ラクトフェリンおよびラクトパーオキシダーゼを有効成分として投与することからなる角膜障害治療方法。
7. ラクトフェリンを有効成分として投与することからなる角膜障害治療方法。
- 15 8. ラクトパーオキシダーゼを有効成分として投与することからなる角膜障害治療方法。
9. 該有効成分を点眼投与する請求の範囲6～8の内いずれか1の角膜障害治療方法。
10. ラクトフェリンおよび／またはラクトパーオキシダーゼの濃度が0.01～3.0%（重量／重量）の範囲にある点眼剤を投与することからなる角膜障害治療方法。
- 20 11. ラクトフェリンおよび／またはラクトパーオキシダーゼの角膜障害治療剤としての使用。

# INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No. PCT/JP91/01539

## I. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER (If several classification symbols apply, indicate all) <sup>6</sup>

According to International Patent Classification (IPC) or to both National Classification and IPC

Int. Cl<sup>5</sup> A61K37/14, 50

## II. FIELDS SEARCHED

Minimum Documentation Searched <sup>7</sup>

Classification System	Classification Symbols
IPC	A61K37/14, 50

Documentation Searched other than Minimum Documentation  
to the Extent that such Documents are Included in the Fields Searched <sup>8</sup>

## III. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT <sup>9</sup>

Category <sup>10</sup>	Citation of Document, <sup>11</sup> with indication, where appropriate, of the relevant passages <sup>12</sup>	Relevant to Claim No. <sup>13</sup>
Y	Biochimica et Biophysica Acta, Vol. 715, No. 1, (1982), p. 116-120	1-11
Y	JP, A, 02-48534 (Societe Bio Cera S.A.), February 19, 1990 (19. 02. 90), Column of claim	1-11

<sup>10</sup> Special categories of cited documents: <sup>10</sup>

- <sup>"A"</sup> document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance
- <sup>"E"</sup> earlier document but published on or after the international filing date
- <sup>"L"</sup> document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)
- <sup>"O"</sup> document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means
- <sup>"P"</sup> document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

<sup>"T"</sup> later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention

<sup>"X"</sup> document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step

<sup>"Y"</sup> document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art

<sup>"S"</sup> document member of the same patent family

## IV. CERTIFICATION

Date of the Actual Completion of the International Search

February 3, 1992 (03. 02. 92)

Date of Mailing of this International Search Report

February 12, 1992 (12. 02. 92)

International Searching Authority

Japanese Patent Office

Signature of Authorized Officer

## 国際調査報告

国際出願番号 T/JP 91/01539

## I. 発明の属する分野の分類

国際特許分類 (IPC) Int. Cl.  
A 61 K 37/14, 50

## II. 国際調査を行った分野

調査を行った最小限資料

分類体系	分類記号
IPC	A 61 K 37/14, 50

最小限資料以外の資料で調査を行ったもの

## III. 関連する技術に関する文献

引用文献の カテゴリ	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	請求の範囲の番号
Y	Biochimica et Biophysica Acta, 第715巻、第1号、(1982), p.116-120	1-11
Y	J.P. A. 02-48534 (ソシエテ ピオ セラ エス. ア), 19. 2月. 1990 (19. 02. 90). 特許請求の範囲の項	1-11

## ※引用文献のカテゴリ

「A」特に関連のある文献ではなく、一般的技術水準を示すもの  
 「E」先行文献ではあるが、国際出願日以後に公表されたもの  
 「L」優先権主張に疑義を提起する文献又は他の文献の発行日  
 若しくは他の特別な理由を確立するために引用する文献  
 (理由を付す)  
 「O」口頭による開示、使用、展示等に言及する文献  
 「P」国際出願日前で、かつ優先権の主張の基礎となる出願の  
 日の後に公表された文献

「T」国際出願日又は優先日の後に公表された文献であって出  
 願と矛盾するものではなく、発明の原理又は理論の理解  
 のために引用するもの  
 「X」特に関連のある文献であって、当該文献のみで発明の新  
 規性又は進歩性がないと考えられるもの  
 「Y」特に関連のある文献であって、当該文献と他の1以上の  
 文献との、当業者にとって自明である組合せによって進  
 歩性がないと考えられるもの  
 「&」同一パテントファミリーの文献

## IV. 認証

国際調査を完了した日

03.02.92

国際調査報告の発送日

12.02.92

国際調査機関

日本国特許庁 (ISA/JP)

権限のある職員

4C 8317

特許庁審査官

小柳正之